

Aus dem Pathologisch-Anatomischen Institut
(Direktor: Professor Dr. med. V. Becker)
und dem Institut für Pharmazie und Lebensmittelchemie,
Lehrstuhl für Angewandte Chemie,
(Direktor: Professor Dr. O. Dann)
der Universität Erlangen-Nürnberg

Die Wirkung von Chlortetracyclin und DAPI auf die Gewebsformen der Nagetiermalaria (*Plasmodium berghei yoelii*)

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
der Medizinischen Fakultät
der Friedrich-Alexander-Universität
Erlangen-Nürnberg

vorgelegt von
Richard Kellner
aus Alberndorf

1981

Aus dem Pathologisch-Anatomischen Institut
(Direktor: Professor Dr. med. V. Becker)
und dem Institut für Pharmazie und Lebensmittelchemie,
Lehrstuhl für Angewandte Chemie,
(Direktor: Professor Dr. O. Dann)
der Universität Erlangen - Nürnberg

Die Wirkung von Chlortetracyclin und DAPI auf die Gewebsformen der Nagetiermalaria (*Plasmodium berghei yoelii*)

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
der Medizinischen Fakultät
der Friedrich-Alexander-Universität
Erlangen - Nürnberg

vorgelegt von
Richard Kellner
aus Alberndorf

Gedruckt mit Erlaubnis der Medizinischen Fakultät
der Universität Erlangen-Nürnberg



Dekan: Prof. Dr. med. W. Kersten

Referent: Prof. Dr. med. H. Schmidt

Korreferent: Prof. Dr. med. V. Becker

Tag der mündlichen Prüfung:

02. MRZ. 1981

Inhaltsverzeichnis

	Seite
Einleitung	1
Material und Methoden	5
Ergebnisse	
der experimentellen Untersuchungen	8
der histologischen Untersuchungen	10
Quantitative Auswertung der Leberschnitte	15
Morphologie der Gewebsformen	16
Fluoreszenzoptische Befunde	18
Diskussion	21
Zusammenfassung	27
Tabellen	29
Abbildungen	34
Literaturverzeichnis	37
Lebenslauf	40



Digitized by the Internet Archive
in 2026

E I N L E I T U N G

Seit der Entdeckung des Plasmodium berghei durch VINCKE und LIPS im Jahre 1948 und der in den darauffolgenden Jahren gewonnenen Erkenntnis, daß sich dieser Erreger auch auf kleine Labortiere wie Mäuse und Ratten übertragen läßt, hat dieser Parasit zunehmend Verwendung für die Prüfung von möglichen Wirkstoffen gegen Malaria gefunden (PETERS). Während die großen Forschungsprogramme zur Auffindung neuer Malariamittel in den 40iger Jahren ausschließlich auf die Verwendung der Vogel malaria zu Testzwecken angewiesen waren, werden in der pharmazeutischen Industrie heute zur Prüfung fast nur noch Infektionen von Mäusen mit verschiedenen Stämmen der Nagetier malaria verwendet. Man unterscheidet hier verschiedene Arten und Unterarten, wie z.B. Plasmodium vinckei oder Plasmodium chabaudi oder das in dieser Untersuchung verwendete Plasmodium berghei yoelii. Diese breite Anwendung gilt jedoch nur für die Prüfung einer Wirkung gegen die Blutinfektion, die sogenannte erythrozytäre Phase der Malaria, da diese sich durch Übertragung infektiösen Blutes auf beliebig viele Mäuse experimentell leicht handhaben läßt.

Viel schwieriger ist es jedoch, die Nagetier malaria experimentell durch geeignete Mücken bzw. mittels der in diesen sich entwickelnden Sporozoiten zu übertragen.

Hier hat erst die Ende der 60iger Jahre gewonnene Erkenntnis, daß die Erregerformen in der Mücke gegenüber Temperaturen von über 23° Celsius sehr empfindlich sind, Abhilfe schaffen können (VANDERBERG, NUSSEN-ZWEIG u. MOST). Trotzdem sind auch heute noch die Möglichkeiten, kleine Labortiere in größerer Zahl mit Sporozoiten zu infizieren, nur in beschränktem Umfange möglich. Dies ist als großer Nachteil zu betrachten, da gerade gegen die aus den Sporozoiten hervorgehenden sogenannten exoerythrozytären Formen der Malaria außer dem relativ toxischen Primaquin und dem Pyrimethamin sich keine Präparate auf dem Markt befinden (NAUCK). Primaquin war noch Ende der 40iger Jahre in den damals verwendeten Vogelmalariaversuchen entdeckt worden (WISELOGLE). Die Frage, ob nicht durch die Verwendung der menschlichen Malaria wesentlich ähnlicheren Nagetiermalaria bessere und wirksamere Präparate auch gegen die menschliche Infektion der Leber aufgefunden werden könnten, ist daher von großem Interesse. Entwickeln sich doch die präerythrozytären Formen der Nagetiermalaria im retikuloendothelialen System, während sich die Sporozoiten der Säugetiermalaria in ihrer Entwicklung auf die Parenchymzellen der Leber beschränken (GARNHAM).

Im Biologischen Prüfungslaboratorium des Instituts für Pharmazie und Lebensmittelchemie der Universität Erlangen-Nürnberg ist die zyklische Übertragung von Plasmodium berghei yoelii seit vielen Jahren zur Routine geworden. Durch langjährige zyklische Übertragung des Erregers mit Anopheles stephensi ist offensichtlich eine solche Anpassung erreicht worden, daß heute Labormäuse bereits mit wenigen hundert Sporozoiten erfolgreich infiziert werden können (FINK, 1970), was ein ausgedehntes und

umfangreiches Screening von Verbindungen auf eine Wirksamkeit gegen Gewebsformen dieser Malariaerreger ermöglicht. Durch die große Menge der verfügbaren infektiösen Sporozoiten ist es ferner möglich, Mäuse mit einer sehr großen Zahl von Sporozoiten zu infizieren. Dadurch ist die Voraussetzung geschaffen, die aus diesen Sporozoiten in der Leber sich entwickelnden Gewebsformen histologisch zu erfassen.

In der Chemotherapie der Malaria ist es ein bekanntes und noch immer mit einem Fragezeichen versehenes Problem, weshalb verschiedene Präparate nur eine Wirksamkeit gegen eine Entwicklungsform des Erregers zeigen. So ist das oben erwähnte Primaquin beispielsweise gegen die Blutformen der menschlichen Malaria weitgehend wirkungslos, während das gegen die Blutformen besonders wirksame Resochin sowie das altbekannte Chinin gegen die Gewebsformen der menschlichen Malaria nichts auszurichten vermögen. Es hat sich gezeigt, daß diese Beobachtung mit geringen Einschränkungen auch für die Nagetiermalaria zutrifft (FINK und KRETSCHMAR).

Im Zusammenhang mit Untersuchungen, die darauf abzielen, die Frage zu klären, ob diese spezifische Wirkung auf Unterschieden im Stoffwechsel der einzelnen Parasitenstadien beruht, oder ob sie auf eine unterschiedliche Anreicherung der Wirkstoffe in dem parasitierten Erythrozyten bzw. in der parasitierten Leberzelle zurückgeführt werden kann, sollte hier zunächst die Möglichkeit geprüft werden, ob diese Frage mit Hilfe von stark fluoreszierenden Verbindungen, wie z.B. Chlortetracyclin und dem neuerdings in der biomedizinischen Forschung vielfach verwendeten 4',6-Diamidino-2-phenyl-indol (DAPI), beantwortet werden kann.

Die Wirksamkeit von Chlortetracyclin bei der Blutinfektion der Nagetiermalaria war von einigen Untersuchern bereits nachgewiesen worden (COATNEY and GREENBERG, AVIADO). Daß die aromatischen Diamidine, zu denen DAPI zu rechnen ist, eine Wirkung gegen Plasmodien zeigen können, war durch Untersuchungen von HEISCHKEIL am Beispiel des Berenils^R und Pentamidin gezeigt worden. Alle diese Untersuchungen beschränkten sich jedoch auf den Nachweis der Wirkung gegen die Blutformen der entsprechenden Laboratoriumsinfektionen.

In der vorliegenden Untersuchung wurde daher zunächst geprüft, ob die beiden genannten Verbindungen gegen die Gewebsformen von Plasmodium berghei yoelii wirken, was mittels eines experimentellen Standardverfahren zur Prüfung auf kausalprophylaktische Wirksamkeit herauszufinden war. Zum anderen sollte versucht werden, die Einwirkung der Versuchsverbindungen auf die Gewebsformen morphologisch nachzuweisen, und, wenn möglich, auch Unterschiede in der Verteilung der Präparate in Leberzellen bzw. Parasiten aufzuzeigen. Zu diesem Zweck wurden Mäuse mit vielen Tausenden von Sporozoiten infiziert und vor Ablauf der exoerythrozytären Schizogonie getötet, die Lebern entnommen und histologisch untersucht. Über die Ergebnisse dieser Untersuchungen wird hier berichtet.

M A T E R I A L U N D M E T H O D E N

Als Erreger wurde der Stamm 17 X von Plasmodium berghei yoelii verwendet, der 1966 von LANDAU und KILLICK-KENDRICK beschrieben wurde. Dieser Stamm wurde im gleichen Jahr von London nach Erlangen gebracht und seither in ununterbrochener Folge zyklisch mit Anopheles stephensi auf NMRI/Kisslegg-Mäuse übertragen.

Zur Übertragung wurde in Erlangen ein alter Laborstamm von Anopheles stephensi verwendet, der gleichfalls aus der London School of Tropical Medicine and Hygiene aus dem Labor von Prof. Dr. P. C. C. GARNHAM bezogen wurde. Die Charakteristik dieses Stammes und der Überträgermücken sowie der resultierenden Infektionen sind von WERY ausführlich beschrieben worden. Über die Verwendung des Stammes zur Prüfung von Arzneimitteln und anderer Einflüsse auf die Infektiosität von Sporozoiten und die sich daraus entwickelnden Gewebsformen hat FINK (1970) berichtet. Zur Infektion wurden ausschließlich weibliche NMRI/Kisslegg-Mäuse verwendet. Die Mäuse wurden in Macrolon^R-Käfigen von ca. 400 cm² Bodenfläche in Gruppen von 5 - 8 Tieren gehalten. Sie wurden mit Altromin^R-Standarddiät für Mäuse gefüttert, die wie das Wasser ad libitum zur Verfügung stand. Die Tiere wurden bei einer Raumtemperatur von 23 - 25⁰ Celsius und einem Tag-Nachtrhythmus von 12 Stunden gehalten.

Zur Gewinnung der Sporozoiten ließ man frisch geschlüpfte Anopheles-Weibchen an parasitierten Mäusen saugen, die zahlreiche Gametozyten im peripheren Blut

zeigten. Der Infektionserfolg in den Mücken wurde durch Sektion einer Probe aus der jeweiligen Mückengruppe bestimmt. Nur solche Mückengruppen wurden bis zum Auftreten der Sporozoiten in den Speicheldrüsen weiter gehalten, die bis zum 10. Tag p.i. zumindest einen 50 %igen Befall des Mitteldarms aufwiesen. Die parasitierten Mücken wurden bei einer Raumtemperatur von 22 - 24° Celsius, 75 - 95 % relativer Feuchte und einem Rhythmus von 14 Stunden Tag und 10 Stunden Nacht gehalten.

Zur Gewinnung der Speicheldrüsen wurden die parasitierten Mücken zwischen dem 21. und 28. Tag nach der Blutmahlzeit durch Schütteln in einem Glasröhrchen immobilisiert. Die Speicheldrüsen wurden nach den üblichen Methoden durch Sektion des Thorax gewonnen und mit einer Pipette in einem Medium aufgesogen, das aus einer Mischung von Kälberserum und Aqua dest. im Verhältnis 2:1 bestand. Es wurden für einen Versuch in der Regel zwischen 80 und 120 Mücken in dieser Weise präpariert. Die gewonnenen Speicheldrüsen wurden in einem Gewebshomogenisator zerkleinert. Der Gehalt an Sporozoiten wurde durch Auszählen einer Probe in einer Blutzählkammer unter Phasenkontrast bestimmt. Durch Verdünnen der sporozoitenhaltigen Suspension mit dem beschriebenen Medium konnte die jeweils gewünschte Sporozoitenzahl im Inokulum erreicht werden. Diese wurde so gewählt, daß die gewünschte Sporozoitenzahl in 0,2 ml Medium pro Maus appliziert werden konnte. Die Inokulation der Sporozoiten erfolgte durch intra-venöse Injektion in eine Schwanzvene.

Für die histologischen Untersuchungen wurde den parasitierten Tieren die Leber 42 - 46 Stunden nach der

Inokulation der Sporozoiten entnommen. Die Tiere wurden hierzu durch Genickschlag getötet und die entnommenen Lebern in Carnoy (ROMEIS) fixiert. Die Organe wurden nach den üblichen histologischen Methoden in Paraffin eingebettet, ca. 4 u dick geschnitten und nach Giemsa gefärbt (ROMEIS).

Die Behandlung wurde durchgeführt mit Chlortetracyclin der Firma MERCK und 4',6-Diamidino-2-phenyl-indol (DAPI), das von Prof. Dr. O. Dann, Lehrstuhl für Angewandte Chemie, Institut für Pharmazie und Lebensmittelchemie der Universität Erlangen-Nürnberg, freundlicherweise zur Verfügung gestellt wurde. Die Substanzen wurden in Aqua dest. so gelöst, daß die entsprechende Menge in 0,1 ml Lösung pro 10 g Maus appliziert werden konnte. Die Behandlung erfolgte mit DAPI intraperitoneal, mit Chlortetracyclin oral, zu den bei den Versuchsergebnissen angegebenen Zeiten.

Die kausalprophylaktische Wirksamkeit wurde durch Blutausstriche kontrolliert, die täglich vom 4. Tag p.i. an durch Blutentnahme aus der Schwanzspitze angefertigt und nach Giemsa gefärbt wurden. Die Parasitämie wurde mikroskopisch bestimmt. Wurden bis zum 14. Tag p.i. keine Parasiten im peripheren Blut nachgewiesen, so galten die Tiere als nicht parasitiert. Nach den am Biologischen Prüfungslaboratorium vorliegenden Erfahrungen ist nach dem 12. Tag mit dem Auftreten einer Parasitämie nicht mehr zu rechnen. Die mittlere kausalprophylaktische Dosis (CPD 50) wurde nach dem Verfahren von LITCHFIELD und WILCOXON berechnet. Weitere Einzelheiten zu der Methode der Bestimmung einer kausalprophylaktischen Wirkung sind bei FINK (1970) beschrieben.

ER G E B N I S S E

1. Ergebnisse der experimentellen Untersuchungen

Zur Prüfung der kausalprophylaktischen Wirkung von Chlortetracyclin und DAPI wurden 1.000 Sporozoiten pro Maus intravenös inokuliert. 4 - 6 Stunden nach der Injektion der Parasiten wurden die Tiere einmal intraperitoneal (DAPI) bzw. oral (Chlortetracyclin) mit abgestuften Dosen der Präparate behandelt. Vom 4. Tag nach der Inokulation bzw. Behandlung an wurden täglich von diesen Tieren Blutaussstriche angefertigt und auf das Auftreten von Parasiten kontrolliert. Die Tiere, die bis zum 12. Tag nach der Inokulation keine Parasiten in 100 Zählfeldern (Objektiv 40 x) aufwiesen, wurden als geschützt betrachtet. Ein Zählfeld umfaßte dabei ca. 500 Erythrozyten.

Es wurden insgesamt sechs Versuche durchgeführt, die in Tabelle 1 zusammengestellt sind. Mit Chlortetracyclin wurde zunächst 1 Versuch mit 100 mg/kg Körpergewicht durchgeführt. Es zeigte sich, daß diese Dosierung noch nicht 100 %ig kausalprophylaktisch wirkt. In einem weiteren Versuch wurde daher die Dosierung zusätzlich auf 300 mg/kg Körpergewicht erhöht, gleichzeitig auf 30 mg/kg Körpergewicht herabgesetzt. Zur Sicherung des Versuchsergebnisses wurde noch ein 3. Versuch mit Dosierungen von 100 mg/kg, 30 mg/kg und 10 mg/kg durchgeführt. Letztere Dosierungen erwiesen sich dabei als nicht mehr kausalprophylaktisch wirksam.

In ähnlicher Weise wurde mit der Verbindung DAPI verfahren. Hier wurde zur Orientierung zunächst ein Versuch mit 10 mg/kg durchgeführt, der nur 2 von 7 inokulierten Tieren vor dem Auftreten einer Infektion schützte. Im nächsten Versuch wurde daher die Dosierung auf 100 mg/kg erhöht und auf 1 mg/kg herabgesetzt. Die Dosis von 100 mg/kg erwies sich dabei eindeutig als toxisch: 5 von 6 behandelten Tieren starben unmittelbar nach der Behandlung. Das überlebende Tier erwies sich über die Beobachtungszeit hinweg als parasitenfrei. 10 mg/kg bewirkten in diesem Versuch noch in 5 von 6 Tieren einen sicheren prophylaktischen Schutz. In einem dritten Versuch mit enger abgestufter Dosierung von 15, 10 und 5 mg/kg war die Dosierung von 10 mg/kg in 7 von 7 Tieren nicht mehr prophylaktisch wirksam.

Die Ergebnisse dieser Versuche wurden zur Ermittlung der mittleren kausalprophylaktischen Dosis (CPD 50) zusammengefaßt. Die Werte sind in der Tabelle 2 zusammengestellt. Aus diesen Werten errechnet sich für Chlortetracyclin bei einmaliger oraler Verabreichung eine mittlere kausalprophylaktische Dosis von 33 mg/kg und für DAPI bei einmaliger intraperitonealer Verabreichung 11 mg/kg. Letzteres befindet sich damit größenordnungsmäßig im Bereich der kausalprophylaktisch wirksamen 8-Aminochinoline, zu denen Primaquin gehört (Tabelle 3).

Zum Ausschluß einer Wirkung auf die Blutformen, die aus den präerythrozytären Formen hervorgehen, wurde in getrennten Versuchen eine vergleichbare Anzahl von Mäusen mit einer sicher kausalprophylaktisch wirksamen Dosis von 100 mg/kg Chlortetracyclin oral bzw. 30 mg/kg

DAPI intraperitoneal behandelt und 2 Tage später intraperitoneal mit Blutformen von Plasmodium berghei yoelii inokuliert. Diese Zeitspanne wurde gewählt, weil die präerythrozytäre Phase 48 Stunden dauert. In allen so behandelten Tieren kam es zu einer patenten Parasitämie ohne zeitliche Verzögerung gegenüber unbehandelten Kontrolltieren, womit eine mögliche Retardwirkung auf Blutformen mit Sicherheit ausgeschlossen werden konnte.

2. Ergebnisse der histologischen Untersuchungen

Nachdem in den experimentellen Untersuchungen die sicher kausalprophylaktisch wirksame Dosis der beiden Präparate festgestellt worden war, wurden Mäuse mit sehr hohen Dosen von Sporozoiten inokuliert und in verschiedenen Zeitabständen mit den Versuchsverbindungen behandelt, um deren Einwirkung auf die Gewebsformen in der Leber histologisch untersuchen zu können.

Der präerythrozytäre Schizogoniezyklus von Plasmodium berghei yoelii dauert ca. 48 - 52 Stunden (LANDAU und KILLICK-KENDRICK). Während dieses Zeitraums reifen in einer Pseudozyste, die von der Leberparenchymzelle umgeben ist, 8 - 12 Tausend Merozoiten heran. In der für die Plasmodien typischen Schizogonie werden dabei die Kerne der Tochterindividuen in einer Zerfallsteilung des Mutterzellkernes erst in der allerletzten

Phase der Zellteilung gebildet. Weder für Chlortetracyclin noch für DAPI ist bekannt, in welcher Phase der Zellteilung sie ihre Wirksamkeit gegen die Malaria-parasiten entfalten. Zur Bestimmung der kausalprophylaktischen Wirkung wurden die beiden Präparate daher möglichst frühzeitig, d.h. 2 - 4 Stunden nach der Inokulation der Sporozoiten verabreicht. Auf Grund der Pharmakokinetik von Chlortetracyclin (GOODMAN-GILMAN) muß angenommen werden, daß dies noch über 24 Stunden hinweg eine Wirkung auf die Gewebsformen ausüben konnte. Ähnliches ist von DAPI anzunehmen, das ebenfalls über 24 Stunden hinweg in der Maus nachgewiesen werden kann (KALIOWDA).

Nach den Ergebnissen der Wirkungsprüfung an Mäusen wäre es daher naheliegend gewesen, die Behandlung auch für die histologischen Untersuchungen möglichst frühzeitig nach der Inokulation der Sporozoiten zu beginnen. Dagegen sprach jedoch die Überlegung, daß bei einem sehr frühzeitigen Behandlungsbeginn die Gewebsformen noch sehr klein und lichtmikroskopisch im Lebergewebe schwer zu erkennen sind. Eindeutig identifizieren lassen sich Gewebsformen erst, wenn sie zu einer die Leberparenchymzelle deutlich übertreffenden Größe herangewachsen sind. Diese Größe wird jedoch nicht vor 20 - 24 Stunden nach dem Eindringen der Sporozoiten erreicht (LANDAU und KILICK-KENDRICK).

In einem ersten Versuch wurden daher zusätzlich zu den mit 1.000 Sporozoiten pro Maus inokulierten Versuchstieren zur Prüfung der chemotherapeutischen Wirkung noch zusätzlich drei Mäuse mit je 15.000 Sporozoiten pro Tier inokuliert. Je eines dieser Tiere wurde

20, 28 und 44 Stunden nach der Inokulation mit 100 mg/kg Chlortetracyclin einmal oral behandelt. Vier Stunden nach der Behandlung wurde den Tieren die Leber entnommen und histologisch aufgearbeitet. Von jeder Leber wurden 10 Schnitte aus verschiedenen Regionen angefertigt, nach Giemsa gefärbt und unter dem Mikroskop auf die Anwesenheit von Gewebsformen untersucht. In keinem der insgesamt 30 Präparate konnten Gewebsformen gefunden werden. Daraus kann gefolgert werden, daß

1. Chlortetracyclin mindestens 4 Stunden nach oraler Verabreichung in ausreichender Konzentration an die Gewebsformen herankommt, um diese zum Absterben zu bringen,
2. die Gewebsformen in einem Zeitraum von 20 - 44 Stunden nach der Inokulation der Sporozoiten für dieses Antibiotikum gleich empfindlich sind, d.h. sowohl in der frühen, hauptsächlich der Proteinsynthese dienenden Entwicklungsphase, wie auch in der späteren Kernteilungsphase, und
3. die Gewebsformen bereits nach sehr kurzer Einwirkungsdauer des Präparates abgestorben und völlig resorbiert sind.

In einem 2. Versuch wurden in ähnlicher Weise zusätzlich zu den Versuchstieren für die Prüfung der chemotherapeutischen Wirkung 3 Mäuse mit je 100.000 Sporozoiten inokuliert. Je 2 Tiere wurden mit 10 mg/kg DAPI intraperitoneal nach 24 und 44 Stunden behandelt. 3 Stunden nach der Behandlung wurde diesen Tieren die Leber entnommen und histologisch aufgearbeitet. Das dritte, mit 100.000 Sporozoiten infizierte Tier, blieb unbehandelt. Ihm wurde die Leber nach 48 Stunden, d.h.

kurz vor Ablauf der Schizogoniephase entnommen. Während die unbehandelten Kontrolltiere des Therapieversuches die übliche Präpatenzzeit zeigten und in den Schnitten des getöteten unbehandelten Kontrolltieres zahlreiche Gewebsformen aufzufinden waren, konnte in den Leberschnitten der nach 24 und 44 Stunden behandelten Mäuse keine Gewebsformen in je 10 durchmusterten Präparaten angetroffen werden. Die oben für das Chlortetracyclin getroffenen Feststellungen lassen sich damit auf DAPI übertragen. Das Präparat entfaltet eine deutliche Wirkung bereits in der frühen Phase der Parasitenentwicklung, ist aber auch in der späten Phase der Schizogonie noch in der Lage, die Gewebsformen abzutöten. In beiden Fällen geschieht die Abräumung der Parasiten so rasch, daß sie 3 Stunden nach der Behandlung bereits in der Leber nicht mehr nachweisbar sind.

Dieses rasche Einsetzen der Medikamentwirkung und die überraschend schnelle Abräumung der abgetöteten Parasiten konnte noch in einem 3. Versuch erhärtet werden, bei dem nochmals zusätzlich zu den übrigen Versuchstieren 2 Mäuse mit je 84.000 Sporozoiten inokuliert wurden. Davon wurde ein Tier 44 Stunden nach der Inokulation der Sporozoiten mit 30 mg/kg DAPI intraperitoneal behandelt und die Leber 2 Stunden später entnommen. Das andere Tier blieb unbehandelt als Kontrolltier und wurde gleichzeitig mit dem behandelten Tier, d.h. also insgesamt 46 Stunden nach der Inokulation der Sporozoiten getötet. Während in dem unbehandelten Kontrolltier zahlreiche Gewebsformen nachgewiesen werden konnten, wurden solche in den 10 aus verschiedenen Regionen der Leber entnommenen Schnitten des behandelten Tieres nicht entdeckt. Das bedeutet, daß bereits 2 Stunden nach der Behandlung eine vollständige Abtötung und Abräumung der Parasiten erfolgt war.

Nachdem die vorangegangenen Versuche gezeigt hatten, daß die Behandlung mit Erfolg sehr nahe an den Zeitpunkt der völligen Ausreifung der Parasiten herangelegt werden kann, wurde in dem Hauptversuch die Behandlung erst 46 Stunden nach der Inokulation der Sporozoiten durchgeführt. Ferner wurde den behandelten und unbehandelten Kontrolltieren die Leber bereits 1 Stunde nach der Verabreichung der Präparate entnommen.

In diesem für die histologische und fluoreszenzoptische Auswertung entscheidenden Versuch wurden jeweils 4 Mäuse mit 40.000 Sporozoiten inokuliert. 2 davon wurden behandelt: 1 Tier mit 30 mg/kg DAPI intraperitoneal, das andere mit Chlortetracyclin 100 mg/kg oral. Die Behandlung erfolgte 46 Stunden nach der Inokulation der Parasiten: 1 Stunde später wurden die behandelten Tiere und die beiden unbehandelt gebliebenen Kontrolltiere getötet. Den Tieren wurde die Leber entnommen und wie üblich fixiert und histologisch aufgearbeitet. Eine orientierende Untersuchung der Schnitte ergab, daß in den Lebern aller 4 Tiere zahlreiche Gewebsschizonten vorhanden waren. Damit boten diese Versuchstiere die geeigneten Voraussetzungen, um einen quantitativen Vergleich der Zahl der vorhandenen Gewebsformen durchzuführen, sowie die Morphologie der Gewebsformen zu studieren. Zu diesem Zweck wurden Schnittserien von den Lebern angefertigt. Dabei wurden diese im Block so orientiert, daß möglichst großflächige Schnitte angefertigt werden konnten. Es wurden Schnittserien angefertigt, von denen jeder 10. und 11. Schnitt aufgezogen wurde. Die restlichen Schnitte wurden verworfen. Jeweils 1 Schnittpräparat wurde nach

Giemsa gefärbt, das andere wurde als ungefärbter Paraffinschnitt aufbewahrt für die fluoreszenz-mikroskopische Auswertung.

Quantitative Auswertung der Leberschnitte

Zum quantitativen Vergleich der in der Leber behandelten und unbehandelten Tiere heranreifenden Gewebsformen wurde die Gesamtzahl der in 10 repräsentativen Schnitten aufgefundenen Gewebsformen ausgezählt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 5 dargestellt. Die Ergebnisse der Zählung erwiesen sich dabei in allen Fällen als außerordentlich einheitlich. Im Durchschnitt wurden zwischen 19,4 (Kontrolle II) und 22 (DAPI 30 mg pro kg) Gewebsformen pro Schnitt gezählt. Das einheitliche Zählergebnis beweist, daß die Entnahme der Leber zu einem Zeitpunkt erfolgt war, zu dem die Arzneimittelwirkung noch nicht zu einem völligen Untergang von Gewebsformen geführt hatte. Das Zählergebnis zeigt ferner, daß durch die Bestimmung der Anzahl der Gewebsformen eine Arzneimittelwirkung nicht unbedingt erfaßt wird, wenn z.B. das Medikament eine nur plasmodiostatische Wirkung entfaltet, oder die Leber zu einem Zeitpunkt nach der Behandlung entnommen wird, zu dem die Medikamentwirkung noch nicht zum Parasitenuntergang geführt hat, wie das in diesem Versuch mit Absicht geschah. Es stellte sich daher die Frage, ob eine Arzneimittelwirkung an der Morphologie der Gewebsformen erkannt werden kann.

Morphologie der Gewebsformen

Die nach Giemsa gefärbten Leberschnitte der im letzten Versuch mit Chlortetracyclin bzw. DAPI behandelten Tiere wurden morphologisch-histologisch im Vergleich mit den Gewebsformen der beiden unbehandelten Tiere untersucht.

Die Gewebsformen in der Leber der unbehandelten Kontrolltiere boten das in der Abbildung 1 gezeigte, für die präerythrozytären Formen von Plasmodium berghei yoelii typische Bild der beginnenden Zerfallsteilung (LANDAU und KILLICK-KENDRICK). Das Kernmaterial ist bereits auf zahlreiche im Schnitt ca. 200 - 300 erkennbare abgerundete Kernbezirke verteilt und beginnt in die 8 - 12.000 Einzelkerne der künftigen Merozoiten zu zerfallen. Die parasitierte Parenchymzelle ist gewaltig vergrößert, ihre Zellwand ist als schmaler Saum verschiedentlich noch zu erkennen und umspannt die somit in einer Pseudozyste liegende Gewebsform. Die nahezu sphärisch runden Gewebsformen haben den zu diesem Zeitpunkt zu erwartenden Durchmesser von ca. 35 Mikrometern. Irgendwelche entzündliche Reaktionen des umgebenden Gewebes sind, wie dies für die Gewebsformen der Malaria typisch ist, nicht vorhanden.

Im Gegensatz dazu zeigen die Gewebsformen in der Leber der mit Chlortetracyclin bzw. DAPI behandelten Tiere durchwegs degenerative Veränderungen. Als solche wurden gewertet:

Eine erhebliche Erweiterung des die Gewebsform umgebenden Gewebsspalt; dieser ist manchmal

auch bei Gewebsformen in der Leber unbehandelter Tiere als schmaler Saum zu erkennen. Bei den behandelten Tieren jedoch beträgt dieser Hohlraum mehrere Mikrometer und die in diesem Hohlraum liegende Gewebsform zeigt meist ein sehr dichtes homogenes Protoplasma, welches sich mit Giemsa-lösung stark anfärbt und keine strukturellen Merkmale mehr erkennen läßt (Abbildung 2). Zu-
meist ist die in diesem Hohlraum liegende Gewebsform auch wesentlich kleiner als der Durchschnitt der Formen in der Leber unbehandelter Tiere, was darauf schließen läßt, daß sie durch die Behandlung entweder bereits in ihrem Wachstum zurückgeblieben oder - was wahrscheinlicher ist - bereits im Abbau begriffen ist.

Ein weiteres degeneratives Kennzeichen ist die Bildung von kleinen Vakuolen um das bereits in Zerfallsteilung begriffene Chromatin, wie das auf Abbildung 3 deutlich zu erkennen ist. Daß es sich hier nicht um Artefakte handeln kann, beweist das völlig normale Erscheinungsbild der umgebenden Leberparenchymzellen.

Eine eindeutige Zuordnung bestimmter morphologischer Erscheinungen in den einzelnen Medikamenten konnte jedoch nicht getroffen werden. Alle beschriebenen Degenerationszeichen waren bei den Gewebsformen beider behandelten Tiere zu beobachten.

Fluoreszenzoptische Befunde

Für die fluoreszenzoptischen Untersuchungen wurden ungefärbte Paraffinschnitte verwendet, die ohne weitere Behandlung als Paraffinschnitte auf die Objektträger aufgezogen und unter das Mikroskop gelegt wurden. Die Untersuchung erfolgte im Fluoreszenzauflicht, wobei mit der 365 nm-Hg-Linie angeregt wurde. DAPI besitzt ein Emissionsmaximum im Bereich von 480 nm, Chlortetracyclin fluoresziert in einem etwas langwelligeren Bereich um 520 nm. Für die fluoreszenzoptische Auswertung wurden die Präparate zunächst im Phasenkontrast bei schwacher Vergrößerung aufgesucht, um eine vorzeitige Ausbleichung der Präparate bei Bestrahlung mit UV-Licht zu vermeiden. Im Phasenkontrast waren die bereits ziemlich ausgereiften Gewebsformen unschwer zu erkennen. Es wurde von verschiedenen Präparaten jeweils zunächst eine Gewebsform im Phasenkontrast fotografiert, anschließend wurde mit UV-Licht bestrahlt und von der gleichen Form erneut eine Aufnahme gemacht. Nachdem vor dem jeweiligen ungefärbten Paraffinschnitt ein nach Giemsa gefärbter Schnitt angefertigt worden war, war es möglich, einmal die Gewebsformen auf dem Paraffinschnitt annähernd zu lokalisieren und außerdem konnte in zahlreichen Fällen auch das Bild des gleichen nach Giemsa gefärbten Gewebeparasiten zum Vergleich fotografisch festgehalten werden.

Die Abbildungen 4 und 5 zeigen jeweils eine Gewebsform nach der Anbehandlung mit Chlortetracyclin bzw. DAPI im Phasenkontrast und unter UV-Licht in der durch das Medikament hervorgerufenen Fluoreszenz. Das fluoreszenzoptische Bild zeigt hierbei für die einzelnen Präparate charakteristische Unterschiede.

Bei dem mit Chlortetracyclin behandelten Tier zeigte sich eine Fluoreszenz vor allem in dem Parenchym der Leberzelle und in den Erythrozyten der Leberkapillaren. Die Kerne der Leberzellen selbst schie-
nen wenig von dem Arzneimittel aufgenommen zu haben; im Vergleich zum Plasma der Leberparenchymzelle wirken sie dunkler. Ganz deutlich ist zu sehen, daß auch in den Gewebsparasiten selbst sich die Fluoreszenz in erster Linie auf das Plasma beschränkt. Das Chromatin der Gewebsform tritt fluoreszenzoptisch überhaupt nicht in Erscheinung. Der wesentlichste Befund für unsere Betrachtung ist jedoch die Tatsache, daß sich die Gewebsform in ihrer Fluoreszenzintensität in keiner Weise von den umgebenden Leberparenchymzellen unterscheidet, daß sie vor allem nicht stärker als diese fluoresziert. Das bedeutet, daß die beobachtete Wirkung von Chlortetracyclin auf die Gewebsformen der Nagetiermalaria nicht durch eine spezifische Anreicherung des Medikamentes bewirkt sein kann. Deutlich erkennbar ist in der gezeigten Abbildung ferner die große Vakuole, die den Gewebsparasiten umgibt, sowie der randständige Kern der Leberparenchymzelle.

Bei der Behandlung mit DAPI zeigt sich die Fluoreszenz vor allen Dingen in den Kernen der Leberparenchymzellen, wo sich die Substanz offensichtlich besonders anreichert. Die hohe Affinität dieser Droge zu Kernbestandteilen ist bereits mehrfach beschrieben worden (FINK, pers. Mit.), doch zeigt sich auch eine relativ starke Fluoreszenz im Plasma der Leberparenchymzellen. Überraschend schwach ist jedoch die Fluoreszenz in dem Gewebsparasiten, der auch keine

Merkmale erkennen läßt, d.h. selbst das Chromatin in dem Gewebsparasiten zeigt nur eine geringe Anreicherung der Droge. Damit ist auch für diesen Wirkstoff erwiesen, daß seine spezifische Wirkung auf die Gewebsformen der Malaria nicht durch eine besondere Anreicherung in den Parasitenzellen erklärt werden kann.

DISKUSSION

Die beiden hier untersuchten Präparate, Chlortetracyclin und DAPI, werden beide in der Malariatherapie nicht angewendet. Während das Chlortetracyclin ein weites Spektrum bakterieller Erkrankungen abdeckt und auch mit Erfolg gegen Chlamydien und Mykoplasmen verwendet werden kann, ist das Diamidin DAPI eine Versuchsverbindung, die in erster Linie wegen ihrer besonderen Wirksamkeit gegen Trypanosomeninfektionen von Interesse ist.

Bei Versuchen mit Blutformen von Plasmodium berghei yoelii war Chlortetracyclin erst in nahezu toxischen Dosen von 100 mg/kg gerade noch als wirksam bezeichnet worden (MUDROW-REICHENOW). Andere Tetracycline waren bei der gleichen Infektion noch schwächer wirksam (AVIADO). Diese geringe Wirksamkeit der Tetracycline bei der erythrozytären Phase der Malaria hat dann auch den Einsatz bei der menschlichen Malaria als nicht angebracht erscheinen lassen. Mit einer mittleren kausalprophylaktischen Dosis von 33 mg/kg beim Einsatz gegen die präerythrozytären Gewebsformen der Nagermalaria liegt Chlortetracyclin zwar deutlich über den bisher im Einsatz befindlichen kausalprophylaktisch wirksamen Malariamitteln, aufgrund der wesentlich besseren Verträglichkeit könnte dieses Medikament aber durchaus noch für eine erfolgreiche Therapie in Frage kommen, vorausgesetzt, daß es bei der menschlichen Malaria eine ähnliche Wirksamkeit entfaltet. Dies erscheint jedoch sehr fraglich, da der präerythrozytäre

Schizogoniezyklus bei der menschlichen Malaria wesentlich länger dauert und damit die Stoffwechselprozesse vermutlich wesentlich langsamer ablaufen. Erfahrungsgemäß steigt aber die chemotherapeutische Angreifbarkeit eines Organismus mit dessen Wachstumsgeschwindigkeit bzw. Stoffwechselaktivität. So haben sich bei einem Vergleich der kausalprophylaktischen Wirksamkeit von bekannten Malariamitteln diese bei der Nagetiermalaria ebenfalls als wesentlich wirksamer als bei der menschlichen Malaria erwiesen, was mit der höheren Vermehrungsrate der Nagetierplasmodien in Verbindung gebracht wird (FINK, 1974).

Von den Diamidinen, zu denen das DAPI gehört, ist ein weites Spektrum der biologischen Aktivitäten bekannt. Diamidine wirken gegen bakterielle Infektionen, gegen Mykoplasmen, wie beispielsweise gegen *Pneumocystis carinii*, und auch gegen Pilzinfektionen. Verschiedentlich wurden sie sogar äußerlich gegen bakterielle Infektionen angewendet (SCHÖNBACH und GREENSPAN). Das hauptsächliche Verwendungsgebiet von Diamidinen sind jedoch Trypanosomeninfektionen, wo das Pentamidin gegen die menschliche Schlafkrankheit eingesetzt wird und das Berenil^R gegen die Infektion der Rinder, die Nagana. Eine Wirksamkeit von Berenil^R und Pentamidin gegen die Blutformen der Nagetiermalaria hat HEISCHKEIL beschrieben. Die von ihm beobachtete außerordentliche Wirksamkeit von Pentamidin und Berenil^R gegen die Blutformen von Plasmodium vinckei, die weit über der von Resochin^R und Pyrimethamin lag, ist sicherlich auf die besondere Art seiner Versuchsanordnung zurückzuführen, bei der die Prüfsubstanzen unmittelbar nach der Inokulation der Parasiten ebenfalls in die Bauchhöhle injiziert wurden, so daß nicht auszu-

schließen ist, daß eine mehr desinfizierende Wirkung auf die noch in der Bauchhöhle mit den Medikamenten in Berührung kommenden Parasiten zustande kam. Mit einer mittleren kausalprophylaktischen Dosis von 11 mg/kg liegt das hier untersuchte Diamidin DAPI zwar größenordnungsmäßig noch im Bereich der Wirksamkeit eines so bekannten Malariapräparates wie Primaquin, aber auch hier müssen die Vorbehalte hinsichtlich einer möglichen Wirkung bei der Infektion mit humanpathogenen Plasmodien berücksichtigt werden. Ferner ist bei dem Gedanken an eine Verwendung zur Prophylaxe der menschlichen Malaria an die allgemeine hohe systemische Toxizität der Diamidine zu denken. Wie SCHMIDT, KADUK und FINK zeigen konnten, besitzt DAPI ähnlich wie Berenil^R eine hohe Toxizität insbesondere für Hunde; eine ausgeprägte Kardiotoxizität wurde bei Mäusen beobachtet.

Die hier vorgelegten Untersuchungen sollten jedoch nicht dazu dienen, die mögliche Brauchbarkeit der beiden Drogen zu Prophylaxe der menschlichen Malaria zu untersuchen, sondern sie sollten vielmehr die Frage beantworten, ob die spezifische, gegen die Gewebsstadien der Malaria gerichtete Wirkung auf einer besonderen Anreicherung der beiden Verbindungen in den Parasiten beruht. Die Eigenfluoreszenz der beiden Wirkstoffe war der entscheidende Anlaß für ihre Verwendung in dieser Untersuchung, nachdem orientierende Versuche gezeigt hatten, daß sie eine Wirkung gegen die Gewebsformen der Nagetiermalaria entfalten. Noch immer ist der große Unterschied zwischen der Wirkung von 8- und 4-Aminochinolinen in der Malariatherapie ungeklärt. Die 8-Aminochinolone, zu denen das Primaquin und das früher, bereits in den zwanziger Jahren ent-

deckte 1. synthetische Malariamittel Plasmochin gehören, entfalten eine ausgeprägte Wirkung gegen die Gewebsformen der menschlichen Malaria, sind aber nahezu wirkungslos gegen die entsprechenden Blutformen, die in den Erythrozyten schmarotzen. Umgekehrt sind die 4-Aminochinoline wie das Chloroquin (Resochin^R) und Amodiaquin gegen die erythrozytären Formen der Plasmodien außerordentlich wirksam, besitzen aber keinerlei prophylaktische Wirkung gegen die aus den Sporozoiten hervorgehenden Gewebsformen. Die spezifische Wirkung der 4-Aminochinoline, insbesondere des Resochins^R, sind vielfach mit einer besonderen Anreicherung des Medikaments in den parasitierten Erythrozyten und den erythrozytären Schizonten erklärt worden (PETERS). Es lag daher nahe, die spezifische Wirkung gegen die Gewebsformen bzw. das Fehlen einer solchen Wirkung durch eine besondere Anreicherung in diesen Formen bzw. eine ungenügende Anreicherung zu erklären. Chlortetracyclin und DAPI, die beide gegen die Blutformen der Malaria praktisch unwirksam sind, sollten sich daher in den Gewebsformen in der Leber spezifisch anreichern. Die hier vorgelegten Untersuchungen haben jedoch gezeigt, daß dies in den zur Verwendung kommenden therapeutischen Dosen nicht der Fall ist. Zumindest wurde in den fluoreszenzoptischen Untersuchungen eine nicht über die Anreicherung in den umgebenden Leberparenchymzellen hinausgehende Anreicherung in den Gewebsformen beobachtet. Die ergänzende Untersuchung zur Feststellung, ob die beiden Wirkstoffe in den erythrozytären Formen dieser Malariaart sich in gleicher Weise oder mehr oder weniger stark anreichern, konnte nicht durchgeführt werden, da der starke Hämoglobingehalt der Erythrozyten einen fluoreszenzoptischen Nachweis der Präparate unterbindet.

Seit den Zeiten EHRlich's, der die spezifische Anfärbung von Plasmodien und Trypanosomen sowie anderer Erreger zum Ausgangspunkt seiner chemotherapeutischen Studien gemacht hatte, konnte die spezifische Wirkung von Medikamenten vielfach mit Erfolg auf eine spezifische Anreicherung im Erreger zurückgeführt werden. So ist auch die Wirksamkeit vieler Antibiotika gegen Bakterien mit der selektiv wesentlich höheren Aufnahme dieser Wirkstoffe durch die Erreger zu erklären (GOODMANN and GILMAN). Die hier vorgelegten Untersuchungen konnten jedoch zeigen, daß für die Wirksamkeit der beiden hier untersuchten Stoffe gegen die Gewebsformen der Nagetierplasmodien dies nicht der Fall ist. Es besteht zwar theoretisch noch die Möglichkeit, daß die Wirkstoffe z.T. in einer Form an Substanzen im Parasiten gebunden wurden, die zu einer Löschung der Fluoreszenz geführt haben könnte, doch erscheint dies nach den vorliegenden Erfahrungen als sehr unwahrscheinlich. Es müßte sich in diesem Falle auch um Stoffe handeln, die nur in den Parasiten vorkommen, weil sonst eine ähnliche Fluoreszenzlöschung auch im umgebenden Lebergewebe zu erwarten wäre, wodurch der mögliche Effekt aufgehoben würde.

Als naheliegende Erklärung für die spezifische Wirkung der hier untersuchten Substanzen gegen die Gewebsformen der Nagetiermalaria bietet sich zu allererst wieder der Hinweis auf die bedeutende Vermehrungsgeschwindigkeit der Gewebsformen an, die dazu führt, daß innerhalb von 48 Stunden 8 - 12.000 Tochterindividuen gebildet werden. Wie oben erwähnt, werden solche rasch sich teilenden Zellen dann be-

sonders empfindlich gegenüber den Einwirkungen von Stoffen, die in die Proteinsynthese, wie z.B. die Tetracycline, oder in den Kernteilungsmechanismus, wie die Diamidine, eingreifen.

Z U S A M M E N F A S S U N G

Wie bereits erwähnt, war es der Sinn der vorgelegten Untersuchungen, die Frage zu beantworten, ob die spezifische Wirkung von Chlortetracyclin und dem Diamidin DAPI gegen die Gewebsstadien der Nagetiermalaria auf einer besonderen Anreicherung dieser Wirkstoffe im Parasiten beruht. Der Gedanke drängte sich auf, da die spezifische Wirkung anderer Malariamittel, vor allem die der 4-Aminochinoline, hier insbesondere die des Chloroquins (Resochin^R), damit erklärt wurde (PETERS). Weder Chlortetracyclin, das bekannterweise die Proteinsynthese beeinträchtigt, indem es die Bindung der Transfer - RNS an den Messenger - RNS - Ribosomen - Komplex verhindert, noch DAPI, welches eine hohe Affinität zu Kernbestandteilen aufweist (FINK, pers. Mit.), zeigten in den fluoreszenzoptischen Versuchen eine solche spezifische Anreicherung. Der Wirkungsmechanismus von Chlortetracyclin und DAPI gegen die Gewebsformen der Malaria in der Leber blieb deshalb ungeklärt.

Bei Versuchen, Chlortetracyclin gegen die Blutformen der Malaria einzusetzen, konnten erst in toxischen Dosen von 100 mg/kg Erfolge erzielt werden (MUDROW-REICHENOW).

Beim Einsatz gegen die präerythrozytäre Gewebsphase der Nagetiermalaria wurde für Chlortetracyclin eine kausalprophylaktische Dosis von 33 mg/kg festgestellt. Wegen der besseren Verträglichkeit dieser Verbindung, verglichen mit anderen Malariamitteln, erscheint eine

Therapie der menschlichen Malaria mit Chlortetracyclin möglich. Dies müßte in weiteren Versuchen abgeklärt werden, insbesondere im Hinblick auf den gegenüber der Nagetiermalaria länger dauernden prä-erythrozytären Schizogoniezyklus der menschlichen Malaria. Damit laufen die Stoffwechselprozesse langsamer ab, so daß die chemotherapeutische Angreifbarkeit dieses Organismus aufgrund der langsameren Wachstumsgeschwindigkeit bzw. Stoffwechselaktivität geringer ist.

Für die Versuchsverbindung DAPI beträgt die aus den Versuchen errechnete mittlere kausalprophylaktische Dosis 11 mg/kg. Größenordnungsmäßig liegt diese Dosierung im Bereich des 8-Aminochinolins Primaquin, doch müssen auch für DAPI die oben beim Chlortetracyclin beschriebenen Einschränkungen hinsichtlich der möglichen Wirksamkeit bei einer Infektion mit humanpathogenen Keimen gemacht werden. Außerdem wäre bei einer Verwendung zur Prophylaxe der menschlichen Malaria an die hohe systemische Toxizität zu denken (SCHMIDT, KADUK und FINK).

Voraussetzung für die hier vorgelegten Untersuchungen war die von FINK im Biologischen Prüfungslaboratorium des Instituts für Pharmazie und Lebensmittelchemie der Universität Erlangen-Nürnberg zur Routine gemachte zyklische Übertragung von Plasmodium berghei yoelii mit Anopheles stephensi auf NMRI/Kisslegg-Mäuse.

Tabelle 1:

Kausalprophylaktische Wirkung von Chlortetracyclin
und DAPI bei Plasmodium berghei yoelii in der Maus.
Ergebnisse der einzelnen Versuche. Inokulum 1.000
Sporozoiten/Maus i.v.

Substanz	Dosis (mg/kg)	<u>Tiere parasitiert</u>	Versuch Nr.
		Tiere inokuliert	
Tetracyclin	100	1/6	35 Sb
	300	0/4 (+1 tox.)	36 s
	100	0/5	
	30	5/5	
	100	0/6	38 Sa
	30	1/6	
	10	6/6	
	10	5/7	90 Sb
	100	0/1 (+5 tox.)	90 S
	10	1/6	
DAPI	1	5/6	
	15	1/7	91 Sb
	10	7/7	
	5	7/7	

Tabelle 2:

Kausalprophylaktische Wirkung von Chlortetracyclin und DAPI bei Plasmodium berghei yoelii in der Maus. Zusammenfassung der Ergebnisse zur Berechnung der mittleren kausalprophylaktischen Dosis (SPD 50).

Substanz und Applikationsweise	Dosis	Tiere parasitiert		CPD 50 (mg/kg) 95 % Vertrauensbereich
		Tiere inokuliert	%	
Chlor-tetracyclin	300	0/4	100	
1 x oral	100	1/17	94	33
	30	6/11	45	(18 - 59)
	10	6/6	0	
DAPI	100	0/1	(100)	
1 x ip.	15	1/7	86	11
	10	13/20	35	(9 - 13)
	5	7/7	0	

Tabelle 3:

Wirksamkeit von Chlortetracyclin und DAPI im Vergleich mit kausalprophylaktisch wirksamen Malaria-
präparaten bei Plasmodium berghei yoelii in der Maus.

Präparat	Applikations- weise	N	CPD 50 ⁺⁺ (mg/kg)	95 % Vertrauens- bereich
Chlortetra- cyclin	1 x oral	38	33	18 - 59
DAPI	1 x ip.	34	11	9 - 13
Primaquin ⁺	1 x ip.	84	6,5	4,5 - 9,0
Pyrimethamin ⁺	1 x ip.	100	0,1	0,07 - 0,14

⁺ FINK (1974)

⁺⁺ mittlere kausalprophylaktische Dosis

Tabelle 4:

Wirksamkeit von Chlortetracyclin und DAPI auf die präerythrozytären Gewebsformen von Plasmodium berghei yoelii. Orientierende Versuche zum Nachweis der un- behandelten Gewebsformen in der Leber einzelner Mäuse.

Ver- such Nr.	Präpa- rat	Dosis (mg/kg)	Inoku- lum Sp/Maus	Zeitp. d. Be- handlung (h) p.i.	Zeitp. d. Le- berentn. (h) p.th.	Ge- webs- for- men
Ver- such Nr.	Präpa- rat	Dosis (mg/kg)	Inoku- lum Sp/Maus	Zeitpunkt der Behandl./Leberentn. p.i. p.th.		Ge- webs- for- men
1	Chlor- tetra- cyclin	100	15.000	20 28 44	4 4 4	- - -
2	DAPI	10	100.000	24 44 ø	3 3 ø	- - +
3	DAPI	30	84.000	44 ø	2 ø	- +

Tabelle 5:

Anzahl der präerythrozytären Formen von Plasmodium berghei yoelii in der Leber behandelter und unbehandelter NMRI-Mäuse.

Behandlung	Anzahl der Formen Einzelwerte	pro Schnitt $\bar{x} + s_{\bar{x}}$
Chlortetracyclin 1 x 100 mg/kg oral	19, 18, 21, 21, 21 22, 24, 21, 21, 20	20,8 + 1,6
DAPI 1 x 30 mg/kg ip.	20, 19, 21, 23, 22, 23, 27, 24, 20, 21	22,0 + 2,4
Kontrolle I	19, 21, 24, 18, 17, 21, 26, 22, 19, 20	20,7 + 2,8
Kontrolle II	19, 20, 18, 21, 20 21, 21, 21, 15, 18	19,4 + 2,0

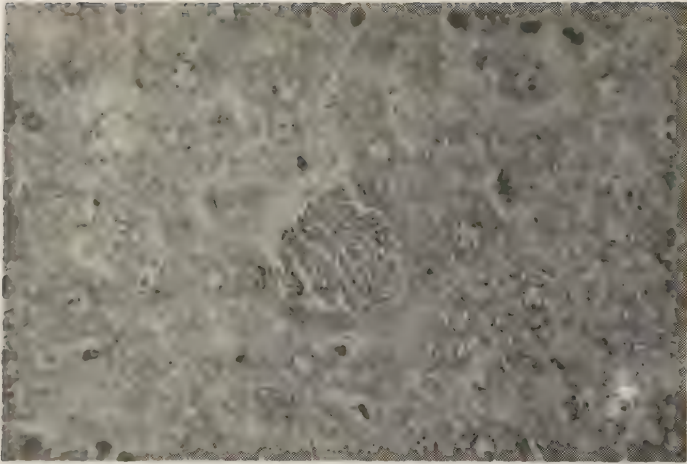


Abb. 1: Im Zerfall begriffene Gewebsform 48 Stunden nach Infektion mit *Plasmodium berghei yoelii*.
Paraffin - Giemsa färbung

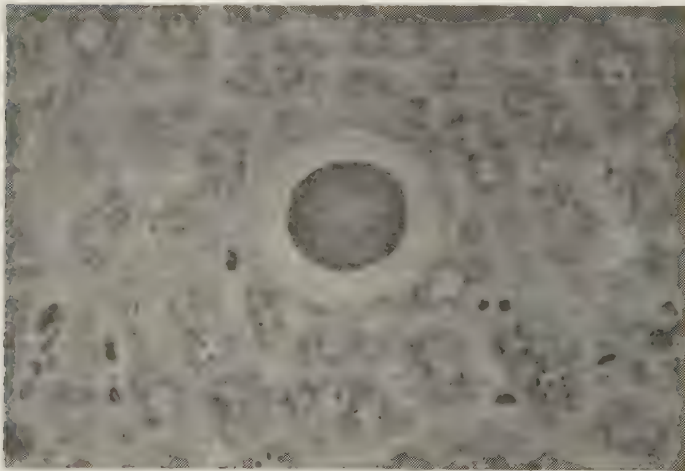


Abb. 2: Strukturlose Gewebsform innerhalb einer Venenkapillare 12 Stunden nach Behandlung mit Chlorotetracyclin.
Paraffin - Giemsa färbung

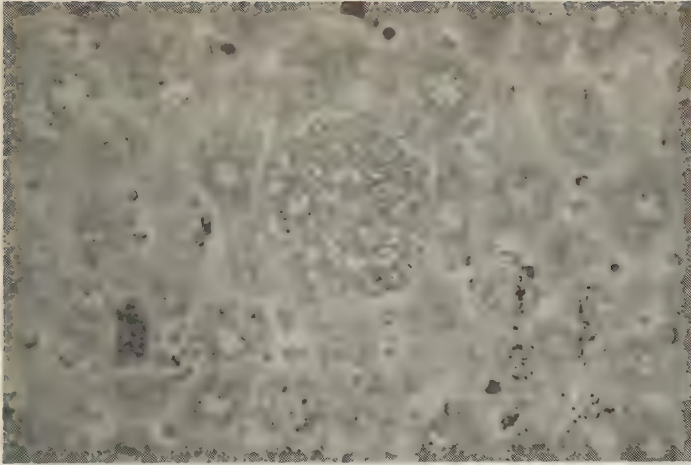


Abb. 3: Verklumpungen und Vakuolen innerhalb einer Gewebsform 2 Stunden nach Behandlung mit Chlortetracyclin.

Paraffin - Giemsaefärbung

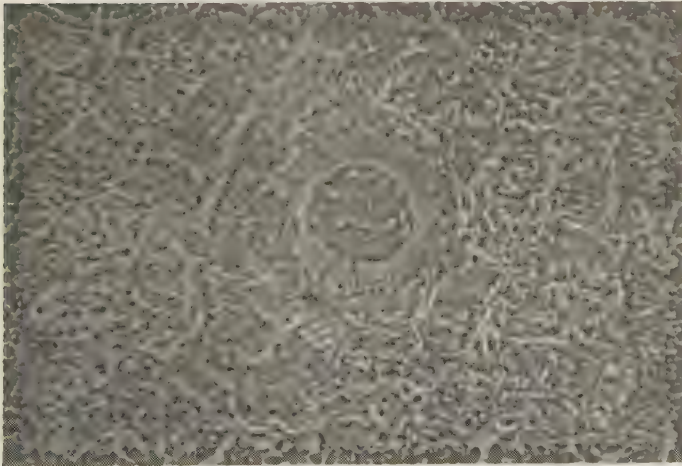


Abb. 4: Gewebsform mit starker regressiver Veränderung 2 Stunden nach Behandlung mit Chlortetracyclin.

Phasenkontrast

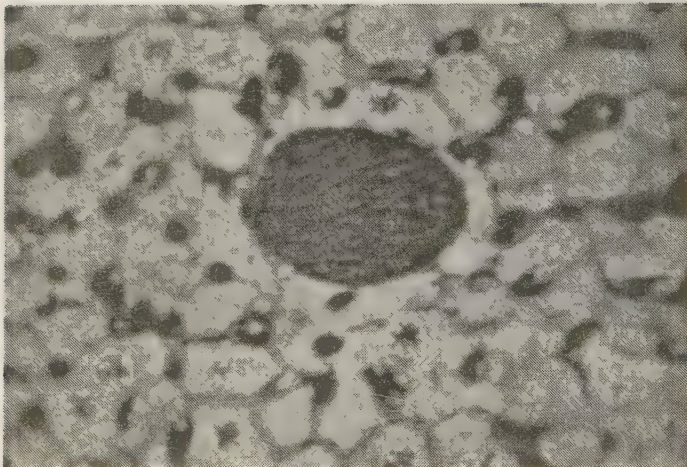


Abb. 5: Gewebsform mit starker regressiver Veränderung
2 Stunden nach Behandlung mit DAPI.
Phasenkontrast

L I T E R A T U R V E R Z E I C H N I S

1. AVIADO, D.M.: Chemotherapy of *Plasmodium berghei*.
Exp. Parasit. 25, 399-482 (1969)
2. COATNEY, G.R. and J. GREENBERG:
The us of antibiotics in the treat-
ment of malaria.
Ann. N.Y. Acad. Sci. 55, 1075-1089 (1952)
3. FINK, E.: Die quantitative Bestimmung der Wirkung
exogener und endogener Faktoren auf
Sporozoiten und Gewebsformen der Klein-
tiermalaria (*Plasmodium cathemerium*,
Plasmodium berghei yoelii).
Z. Tropenmed. Parasit. 21, 357-372 (1970)
4. FINK, E.: Kausalprophylaktische Wirkung von
Standard-Malaria-mitteln bei der Nage-
tiermalaria (*Plasmodium berghei yoelii*).
Z. Tropenmed. Parasit. 23, 35-47 (1972)
5. FINK, E.: The assessment of causal prophylactic
activity in a rodent malaria system
(*Plasmodium berghei yoelii*) and its
value for the development of the new
antimalaria drugs.
Bull. Wld. Hlth. Org. 50, 213-222 (1974)
6. FINK, E. und W. KRETSCHMAR:
Chemotherapeutische Wirkung von
Standard-Malaria-Mitteln in einem ver-
einfachten Prüfungsverfahren an der
Plasmodium vinckei-Infektion der
NMRI-Maus.
Z. Tropenmed. Parasit. 21, 167-181 (1970)

7. GARNHAM, P.C.C.: Malaria parasites and other haemo-sporidia.
Blackwell Scientific Publications,
Oxford 1966
8. GOODMAN, L.S. and GILMAN, A. (eds.):
Pharmacological Basis of Therapeutics.
Fourth ed., Sir Mac Millan & Company,
Toronto 1970
9. HEISCHKELL, R.: Wirksamkeit der Trypanozide Berenil
und Pentamidin bei der Nagetiermalaria
(*Plasmodium vinckei*).
Z. Tropenmed. Parasit. 22, 243-249 (1971)
10. KALIWODA, G.: Verteilung und Ausscheidung der trypano-
ciden Diamidine 6-Amidino-2- (4-amidino-
phenyl)indol bei Maus und Rind sowie
6-Amidino-2- (4-amidinophenyl)thio-
naphthen und 5-Amidino-2- (4-amidino-
phenyl)benzofuran bei der Maus.
Dissertation, Erlangen 1976
11. LANDAU, I. and R. KILLICK-KENDRICK:
Rodent plasmodia of the Republique
Centrafricaine: the sporogony and
tissue stages of *Plasmodium chabaudi*
and *Plasmodium berghei yoelii*.
Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 60,
633-649 (1966)
12. LITCHFIELD, J.T. and F. WILCOXON:
A simplified method of evaluating
dose-effect experiments.
J. pharmacol. experim. therap. 96,
99-113 (1949)
13. MUDROW-REICHENOW, L.:
Über die chemotherapeutische Beein-
flußbarkeit des *Plasmodium berghei*
Vincke und Lips.
Z. Tropenmed. Parasit. 2, 471-485 (1951)

14. NAUCK, E.G.: Lehrbuch der Tropenkrankheiten.
Georg Thieme Verlag, Stuttgart 1975
15. PETERS, W.: Chemotherapy and drug resistance in malaria.
Academic Press, London and New York 1970
16. ROMEIS, B.: Mikroskopische Technik.
R. Oldenbourg Verlag, München-Wien 1968
17. SCHMIDT, H., B. KADUK and E. FINK:
Pathomorphology of side-effects of trypanocidic diamidines.
Vet. Pathol. 15, (4) 574 (1978)
18. SCHÖNBACH, E.B. and E.M. GREENSPAN:
The pharmacology, mode of action, and therapeutic potentialities of stilbamidine, pentamidine, propamidine and other aromatic diamidines - a review.
Medicine 27, 327-377 (1948)
19. VANDERBERG, J.P., R.S. NUSSENZWEIG and H. MOST:
Further studies on the Plasmodium berghei - Anopheles stephensi - rodent system of mammalian malaria.
J. Parasit. 54, 1009-1016 (1968)
20. VINCKE, I.H. and M. LIPS:
Un nouveau Plasmodium d'un rongeur sauvage du Congo, Plasmodium berghei n.sp.
Ann. Soc. Belg. Med. Trop. 28, 97-104 (1948)
21. WERY, M.: Studies on the sporogony of rodent malaria parasites.
Ann. Soc. Belg. Med. Trop. 48, 3-138 (1968)
22. WISELOGLE, F.Y. (editor):
A survey of antimalarial drugs, 1941 - 1945.
J.W. Edwards, Ann Arbor, Mich. 1946

L e b e n s l a u f

Name: Richard Michael Kellner

geboren: 17. März 1948 in Alberndorf/Opf.

Eltern: Vater: Richard Kellner, geb. 23. 09. 21
Mutter: Regina Kellner, geb. 25. 03. 23

Schwester: Hannelore Steinbauer, geb. 29. 03. 50

Ehefrau: Anna - Elisabeth Kellner,
geb. 14. 07. 53

Tochter: Anja Kellner, geb. 14. 01. 80

Ausbildung: Abitur am Gymnasium Schwandorf 1969
1969 - 1971 Apothekerpraktikum
Juli 1971 Pharmazeutische Vorprüfung
Beginn des Medizinstudiums im
Sommersemester 1973
Ärztliche Vorprüfung April 1975
Approbation als Arzt: 1. Juni 1979

Seit Juni 1979 Assistenzarzt an der Inneren Abteilung
des Kreiskrankenhauses Nabburg.

Copy-Center 2000

852 ERLANGEN · Obere Karlstr. 30
Tel. 09131-26197